

#4

PATENT
2669-0117P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Kyung-Ja HAN Conf.: 9476
Appl. No.: 10/026,542 Group: 3736
Filed: December 27, 2001 Examiner:
For: DIAGNOSTIC METHOD OF HEMOLYTIC ANEMIA

L E T T E RAssistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

March 19, 2002

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
KOREA	2000-85709	December 29, 2000

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By 

Joseph A. Kolasch, #22,463

JAK/ndb
2669-0117PP.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000

Attachment



Kyung-Ja HAN
2669-0117P
10/026,542
December 27, 2001
BSKB, LLP
(703) 205-8000



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 특허출원 2000년 제 85709 호
Application Number PATENT-2000-0085709

출원년월일 : 2000년 12월 29일
Date of Application DEC 29, 2000

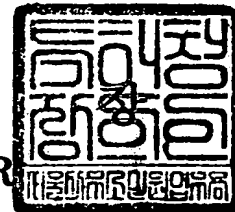
출원인 : (학)가톨릭학원가톨릭중앙의료원
Applicant(s) CATHOLIC MEDICAL CENTER



2002 년 02 월 28 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.02.08
【구명의인】	
【성명】	한경자
【출원인코드】	4-2000-057159-6
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인】	
【명칭】	(학)가톨릭학원가톨릭중앙의료원
【출원인코드】	2-1999-902352-1
【대리인】	
【성명】	홍성표
【대리인코드】	9-2000-000223-9
【포괄위임등록번호】	2000-071554-4
【포괄위임등록번호】	2002-013222-4
【대리인】	
【성명】	이선행
【대리인코드】	9-1998-000432-1
【포괄위임등록번호】	2000-071552-0
【포괄위임등록번호】	2002-013220-0
【대리인】	
【성명】	이현재
【대리인코드】	9-2000-000222-2
【포괄위임등록번호】	2000-071553-7
【포괄위임등록번호】	2002-013221-7
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2000-0085709
【출원일자】	2000.12.29
【심사청구일자】	2000.12.29
【발명(고안)의 명칭】	용혈성 빈혈 검사 방법
【변경원인】	전부양도

【취지】

특허법 제38조4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조제1 항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다. 대리인

홍성표 (인) 대리인

이선행 (인) 대리인

이현재 (인)

【수수료】

13,000 원

【첨부서류】

1. 양도증_1통 2. 인감증명서_1통

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0003
【제출일자】	2000.12.29
【발명의 명칭】	용혈성 빈혈 검사 방법
【발명의 영문명칭】	Diagnostic Method of Hemolytic Anemia
【출원인】	
【성명】	한경자
【출원인코드】	4-2000-057159-6
【대리인】	
【성명】	홍성표
【대리인코드】	9-2000-000223-9
【포괄위임등록번호】	2000-071554-4
【대리인】	
【성명】	이선행
【대리인코드】	9-1998-000432-1
【포괄위임등록번호】	2000-071552-0
【대리인】	
【성명】	이현재
【대리인코드】	9-2000-000222-2
【포괄위임등록번호】	2000-071553-7
【발명자】	
【성명】	한경자
【출원인코드】	4-2000-057159-6
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 홍성표 (인) 대리인 이선행 (인) 대리인 이현재 (인)

【수수료】

【기본출원료】	14 면	29,000 원
【가산출원료】	0 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	1 항	141,000 원
【합계】	170,000 원	
【감면사유】	개인 (70%감면)	
【감면후 수수료】	51,000 원	

【요약서】**【요약】**

본 발명은 미세맥관병성 빈혈과 같이 조각난 적혈구가 혈중에 존재하는 경우 생리 식염수보다 저장액에서 항혈색소를 이용하여 손상된 적혈구를 검출하는 유세포 측정법을 실시하여 용혈성 빈혈의 신속한 진단뿐만 아니라 환자에게 중요한 조각난 적혈구와 중요하지 않은 오래된 조각난 적혈구를 구별할 수 있도록 한 용혈성 빈혈 검사 방법에 관한 것이다.

더욱 상세하게는 환자에서 혈액을 추출한 후 말초혈 $2\mu\text{l}$ 를 PE와 접합시킨 항혈색소 항체로 0.6% 소금물에서 상온에서 15분간 염색한 다음 세척하지 않고 3 ml의 식염수를 첨가하여 유세포 분석기로 분석하는 검사방법으로서, 본 발명의 유세포 분석법은 세척 또는 lysing step이 필요 없으며 결과는 20분 이내에 쉽게 얻을 수 있다. 따라서 혈액 도말에서의 조각난 적혈구의 숫자를 세는 것이 시간 이 오래 걸리고 때때로 눌러진 적혈구와 구별하기도 어려웠으나, 본 실험의 간편하고 신속한 방법을 사용함에 따라 조각난 적혈구와 기타 손상된 적혈구의 정확한 측정이 가능할 뿐만 아니라, 항혈색소 항체를 사용한 유세포 분석기에 의해 새로 생성된 손상 적혈구만을 검출해 내는 신속하고 정확한 용혈성 빈혈 검사 방법을 새로이 제시할 수 있도록 한 것이다.

【색인어】

적혈구, 용혈성 빈혈, 적혈구 검사

【명세서】**【발명의 명칭】**

용혈성 빈혈 검사 방법{Diagnostic Method of Hemolytic Anemia}

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <1> 본 발명은 미세맥관병성 빈혈과 같이 조각난 적혈구가 혈중에 존재하는 경우 생리 식염수보다 저장액에서 항혈색소를 이용하여 손상된 적혈구를 검출하는 유세포 측정법을 실시하여 용혈성 빈혈의 신속한 진단뿐만 아니라 환자에게 중요한 조각난 적혈구와 중요하지 않은 오래된 조각난 적혈구를 구별할 수 있도록 한 용혈성 빈혈 검사 방법에 관한 것이다.
- <2> 기존의 적혈구 검사 방법은 혈액을 추출하여 유리판에 도말 후 염색하여 현미경으로 관찰하였으나 이때 적혈구가 원형이 아니고 눌린 것이 있을 경우 이와 조각난 적혈구를 감별하기 어렵고 조각난 적혈구라 하여도 환자에게 중요한 최근에 파손된 것인지를 명확하게 판단하지 못하여 용혈성 빈혈의 진단 및 치료에 상당한 어려움을 갖고 있었다.
- <3> 즉, 말초 혈액내의 조각난 적혈구의 존재는 미소혈관병성 용혈성 빈혈(MAHA)의 가장 중요한 징후일 뿐만 아니라 파종성 혈관내 응고증과 같은 혈관내 용혈과 관련된 다른 많은 질병에서도 중요한 징후이다.

- <4> 이러한 조각난 적혈구의 존재를 확인하기 위해 이용되는 유일한 방법은 혈액을 도말한 뒤 Romanovsky 염색하여 현미경으로 검사하는 방법이며, 이는 조각난 적혈구의 정량적 분석을 위한 유일한 방법이었다.
- <5> 그러나 이 방법은 노동 집약적이며 시간이 많이 걸리고 찌그러진 정상 적혈구와 조각난 적혈구를 구별하기 어려워 때때로 비장 제거술을 받은 환자가 용혈과 같은 중요한 임상적 증상이 없는 조각난 적혈구 증가증 등의 두드러진 이형 적혈구 증가증이 나타나는 경우도 있다.
- <6> 따라서 말초 혈액내 조각난 적혈구 검사 및 정량화를 신속히 할 수 있는 새로운 방법의 개발이 필요하며, 임상적 중요성을 가지는 새로 생성된 조각난 적혈구와 임상적 중요성이 없는 오래된 조각난 적혈구를 구별할 수 있다면 더욱 바람직할 것이다. 혈관의 용혈증의 경우는 구상 적혈구증과 난형 적혈구증 등의 이형 적혈구 증가증이 자주 관련되어 있다. 자가 면역성 용혈성 빈혈증에서 사용되는 항글로불린 테스트와 같은 각각의 질병을 위한 특별한 실험실 검사법이 이용 가능하긴 하지만 혈관의 용혈증의 초기 진단은 매우 어려운 문제점이 있었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <7> 본 발명은 이와 같은 문제 점을 해결하기 위해 발명한 것으로서,
- <8> 환자에서 혈액을 추출한 후 말초혈 2 μ l를 PE와 접합시킨 항혈색소 항체로 0.6% 소금물에서 상온에서 15분간 염색한 다음 세척하지 않고 3ml의 식염수를 첨가하여 유세포 분석기로 분석하는 검사방법으로서, 본 발명의 유세포 분석법은

세척 또는 lysing step이 필요 없으며 결과는 20분 이내에 쉽게 얻을 수 있다. 따라서 혈액 도말에서의 조각난 적혈구의 숫자를 세는 것은 시간이 오래 걸리고 때때로 눌러진 적혈구와 구별하기도 어려웠으나, 본 실험의 간편하고 신속한 방법을 사용함에 따라 조각난 적혈구등 손상된 적혈구의 정확한 측정이 가능할 뿐만 아니라, 항혈색소 항체를 사용한 유세포 분석기에 의해 새로 생성된 손상 적혈구만을 검출해 내는 신속하고 정확한 용혈성 빈혈 검사 방법을 새로이 제시할 수 있도록 한 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <9> 이하에서 본 발명의 실시예를 상세히 설명하면 다음과 같다.
- <10> 환자에서 혈액을 추출한 후 말초혈 2 μ l를 PE와 접합시킨 항혈색소 항체로 0.6% 소금물에서 상온에서 15분간 염색하는 단계와;
- <11> 상기 염색 후 세척하지 않고 3ml의 식염수를 첨가하는 단계와;
- <12> 상기 3ml의 식염수를 첨가하여 유세포 분석기로 분석하는 단계로 용혈성 빈혈 검사 방법으로 이루어진 것이다.
- <13> 이와 같이 이루어지는 검사방법을 실시하기 위해 먼저 빈혈 환자 70명, 미소혈관병성 용혈성 빈혈(MAHA) 환자 42명, 말라리아 환자 8명, 구상 적혈구증 환자 8명(유전적 구상 적혈구증 환자 3명, 자가 면역성 용혈성 빈혈증 환자 3명, 원인 불명의 구상 적혈구증 환자 2명), 난형 적혈구증 환자 2명, 비장 제거술을

받은 환자 6명, 철 결핍성 빈혈(IDA) 환자 4명과 대조군으로써 건강한 성인 혈소판 제공자 107명을 대상으로 실험하였다.

<14> MAHA 환자 42명중 40명이 급성 또는 만성 백혈병 환자였으며 그들 중 19명이 골수 이식(BMT)을 받았다.

<15> 상기 비장 제거술을 받은 환자 6명 중 4명이 특발성 혈소판 감소성 자반병(ITP) 때문에 15일 내지 5년 전에 비장 제거술을 받았으며 나머지 2명의 환자는 만성 골수성 백혈병에 의한 거대 비종대 때문에 2개월 내지 3년 전에 비장 제거술을 받았다.

<16> 또한 유전적 구상 적혈구증 환자 3명 모두는 부모 및 형제들의 샘플도 조사되었다.

<17> 상기 환자들은 삼투압 취약성 검사 결과 0.52~0.62%의 염화나트륨 용액(c)에서 용혈이 시작되는 것으로 나타났다.

<18> 상기 말라리아 환자 전원은 Plasmodium vivax에 의해 감염되었다.

<19> 본 발명의 실험에서는 적혈구 계산을 위해 EDTA로 항응고시킨 혈액 샘플을 채취 후 4시간 이내에 사용하였고, 분석전에는 상온(18~20℃)에서 보관하였다.

<20> 상기에 샘플환자에 의거하여 본 발명에서 실시한 실험을 상세히 살펴보기로 한다.

<21> 유세포 분석기를 이용한 손상적혈구 분석

- <22> 환자에서 추출된 손상적혈구는 생리 식염수에서는 항혈색소 항체로 염색되지 않았다. 손상 적혈구의 혈색소가 손상된 막을 통해 항혈색소 항체에 노출될 수 있는 적정 식염수 농도를 찾기 위해 MAHA 환자 10명과 정상인 10명으로부터 말초 혈액을 채취하여 0.2%에서부터 2.0% 범위 내에서 농도별로 항혈색소 항체(텐마크, Dako A/S)로 염색하였다. 그 결과 MAHA 환자의 샘플과 정상인 샘플을 구별할 수 있는 적정 농도는 0.6% 식염수인 것으로 나타났다.
- <23> 본 발명에서는 시약의 안정성 검사를 위해, 정상인 5명과 MAHA 환자 5명의 샘플을 0.6% 식염수와 섞은 바로 직후, 1일후, 2일후, 3일후, 4일후, 5일후, 6일후, 7일후에 항체로 염색하였다. 이때 항체는 phycoerythrin(PE)으로 표식을 하였고, 보존제로써 0.1% 젤라틴, 펜타클로로페놀과 함께 인산염 완충 식염수에서 희석되었으며, 항체 염기 용액의 삼투압은 316mOsm/kg이었다. 항혈색소 항체 5 μ l를 각각의 식염수 50 μ l와 혼합하였다.
- <24> 상기 항체 혼합물의 삼투압은 0.6% 식염수에서 213mOsm/kg이었다. 나머지 샘플들은 항체와 0.6% 식염수 혼합물을 사용하여 실험하였다. 그리고 말초 혈액 2 μ l을 이 항체-식염수 혼합물에 첨가하여 상온에서 15분간 방치하였다.
- <25> 상기 말초 혈액 2 μ l을 이 항체-식염수 혼합물에 첨가하여 상온에서 15분간 방치한 상태에서 세척하지 않고 식염수 3ml를 바로 첨가하였다.
- <26> 이때 형광 물질을 CELLQuest 소프트웨어를 사용하여 유세포 분석기(FACSCalibur, Beckton Dickinson)로 분석하였다. 또한 CaliBRITETM 기구(Beckton Dickinson)로 유세포 분석기를 1주일에 2번씩 체크하였고 Autocamp 소프트웨어로 한달에 한번씩 체크하였다.

- <27> 본 발명에서 유세포분석기 통로의 기구 세팅은 선형 모드이고, 전방 산란 (FSC) 역치는 52이며, 20,000개의 세포가 분석되고 저장되었다. 조각난 적혈구 일부가 무손상 적혈구보다 작을 것으로 예상되었기 때문에 무손상 적혈구 및 혈 소판 전체를 포함하는 large gate를 사용하였다.
- <28> 상기 모든 샘플들은 역시 표식을 위해 동형 대조군 항체(Becton-Dickinson, San Jose, CA)로 염색되었고, 표식들은 동형 대조군 혈청을 사용하여 세팅되었으며, 이 방법의 정밀도를 평가하기 위해 정상 샘플 2개, MAHA 샘플 2개를 10번 분석하였다.
- <29> 적혈구 형태의 현미경 검사
- <30> 상기 모든 샘플에서 혈액 도말을 제작하고 공기중에서 건조한 다음 Wright 염색을 실시하고 두 명의 병리전문의가 검사하였다. 1,000배 현미경 시야에서 관찰되는 평균 적혈구수가 대략 200개이기 때문에 본 연구에서는 1,000배 시야에서 관찰되는 조각난 적혈구 수를 센 다음 2로 나눈 값을 조각난 적혈구%로 사용하였다.
- <31> 이상과 같은 유세포 분석기를 이용한 손상적혈구 분석 및 적혈구 형태의 현미경 검사의 통계를 살펴보면, 모든 통계 수치는 독립 표본 T-test로 분석되었다.
- <32> 따라서 항혈색소 표식이 된 적혈구의 비율과 현미경 검사에 의한 조각난 적혈구 숫자의 상관 관계를 평가하기 위해 피어슨 상관 분석으로 계산하였다. 유의성 검사는 SPSS를 이용한 Wilcoxon Signed Ranks test로 실시하였다.

<33> 식염수 농도별 유세포 분석기 검사 결과

<34> 식염수 농도별 유세포 분석기의 검사에서는 0.2% 식염수에서 정상인과 환자
들의 적혈구 50% 이상이 항혈색소로 염색되었고 식염수의 농도가 0.6%까지는 식
염수 농도가 증가함에 따라 염색된 적혈구 비율이 감소하였다.

<35> 상기 0.6% 식염수에서는 MAHA 샘플만이 염색된 적혈구가 1% 이상이었고 정
상인 샘플은 모두 1% 미만이었다. 이보다 높은 식염수 농도(0.7~2.0%)에서는 정
상인이나 MAHA 환자 샘플 모두 항혈색소로 염색되지 않았다.

<36> 0.6% 식염수에서 유세포 분석기의 검사 결과

<37> 상기 각각의 그룹에서 염색된 적혈구 비율을 표 1에 나타내었다.

<38> 【표 1】

group	number of cases	mean±SD(%)
normal control	107	0.55±0.23
microangiopathic	42	2.95±2.95
malaria	8	1.87±0.72
spherocytosis	8	3.02±1.12
postsplenectomy	8	0.78±0.24
iron deficiency anemia	4	0.59±0.11

<39> 본 발명에서 시약은 1주일까지는 안정하였고 염색된 적혈구 비율이 감소하
지 않았으며 분산계수는 15.0%였다. 정상인의 염색된 적혈구 비율은 0.55±0.23%
였고 107명중 7명만이 염색된 적혈구 비율이 1% 이상인 것으로 나타났다.

<40> MAHA 환자의 염색된 적혈구 비율은 정상인보다 유의적으로 높았고(2.95±
2.95%, P=0.000), 42명 중 1명만이 염색된 적혈구 비율이 1% 이하인 것으로 나타

났다. 이때 조각난 적혈구의 숫자는 $3.1 \pm 0.8\%$ 였고 항혈색소에 의해 염색된 적혈구의 비율과 상관관계가 있었다($r=0.637$, $P=0.000$). 말라리아 환자의 염색된 적혈구 비율도 정상인 보다 유의성있게 높았으며($1.87 \pm 0.72\%$, $P=0.001$), 염색된 적혈구의 비율이 1% 보다 적은 유일한 경우는 슬라이드 상에 단 하나의 고리모양의 말라리아 원충인 것으로 밝혀졌다.

<41> 또한 구상 적혈구증 환자의 염색된 적혈구 비율은 정상인보다 유의적으로 높았으며($3.02 \pm 0.12\%$, $P=0.000$), 8명의 샘플 모두가 염색된 적혈구 비율이 1% 이상인 것으로 나타났다. 유전적 구상 적혈구증 환자와 자가면역성 용혈성 빈혈증 환자 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

<42> 본 발명에서 삼투압 취약성 검사 결과 두 명의 유전적 구상 적혈구증 환자의 경우 0.52% 식염수에서 용혈이 시작되었고, 0.6% 식염수에서는 용혈이 나타나지 않았지만 각각 적혈구의 5.06%와 2.24%가 항혈색소에 의해 염색되었다. 나머지 한 명의 유전적 구상 적혈구증 환자의 샘플은 0.62%에서 용혈을 시작하였고 적혈구의 3.40%가 0.6% 식염수에서 항혈색소로 염색되었으며, 환자 아버지의 샘플은 0.52%에서 용혈을 시작하였지만 적혈구의 4.04%가 0.6% 식염수에서 항혈색소로 염색되었다.

<43> 두드러진 난형 적혈구증 환자 2명은 염색된 적혈구가 각각 2.20%와 2.21%였다.

<44> 이전에 비장 제거술을 받은 환자의 염색된 적혈구 비율은 정상인과 비슷하였다($0.78 \pm 0.24\%$, $P=0.069$). 다수의 조각난 적혈구(평균 4.42%)와 유극 적혈구가

말초 혈액에서 발견되었지만 조각난 적혈구의 숫자는 항혈색소에 의해 염색된 적혈구의 비율과 상관관계가 없었다($P=0.853$).

<45> 철 결핍성 환자는 모두 염색된 적혈구 비율이 1% 이하인 것으로 나타났다 ($0.59 \pm 0.11\%$).

<46> 상기와 같이 실시되는 본 발명의 검사방법에 의해 나타난 결과 조각난 적혈구 세포가 혈색소 손실없이 어떻게 혈액내를 순환할 수 있었는지는 밝혀지지 않았다. 조각난 적혈구는 세포질 손실이 발생하므로 우리는 조각난 적혈구를 항혈색소 항체로 염색하고자 시도하였다. 그러나 등장액에서는 염색되지 않았다. 따라서 적혈구를 저장액과 0.6% 식염수에 방치함으로써 손상된 세포질의 일시적인 보호막을 통해 혈색소를 노출시키고자 하였다. 농도가 더욱 낮은 저장액에서는 일부 정상 적혈구도 항혈색소로 염색되었는데, 이는 0.6% 식염수 이하의 저장액에서 방치시킬 경우 정상 적혈구도 손상될 수 있음을 의미하는 것이다. 그리고 2%까지의 식염수와 같은 고정액에서의 방치는 정상 샘플과 MAHA 샘플 모두 적혈구가 항혈색소로 염색되지 않았다. 찌그러진 적혈구는 손상된 세포질을 통해 혈색소를 노출시킬 수 없었다.

<47> 정상인의 염색된 적혈구 비율은 $0.55 \pm 0.23\%$ 였고 MAHA 환자는 정상인보다 유의하게 높았다($2.95 \pm 2.95\%$, $P=0.000$). 조각난 적혈구의 숫자는 항혈색소에 의해 염색된 적혈구의 비율과 높은 상관관계가 있었다($r=0.637$, $P=0.000$). 본 발명의 실험에서 유세포 분석법은 세척 또는 lysing step이 필요 없으며 결과는 20분 이내에 쉽게 얻을 수 있다. 혈액 도말에서의 조각난 적혈구의 숫자를 세는 것은 시간이 오래 걸리고 때때로 눌러진 적혈구와 구별하기도 어렵다. 그러나 본 발명의

실험이 간편하고 신속한 방법을 사용함에 따라 조각난 적혈구의 정확한 측정이 가능하다. 더구나, 비장 제거술을 받은 환자의 경우와 같이 다수의 조각난 적혈구가 세포내 용혈증의 임상적 증상 없이 발견되는 경우가 가끔 있다. 이러한 경우 현미경 검사만으로는 조각난 적혈구의 중요성을 결정하기가 불가능하다. 본 실험의 유세포 분석법을 사용할 경우 비장 제거술을 받은 환자에 존재하는 오래된 조각난 적혈구는 검출되지 않았다. 비장은 손상된 세포들을 순환에서 제거시키는 역할을 하기 때문에 비장 제거술을 받은 환자는 조각난 적혈구가 살아남을 수 있고 손상된 세포질이 지속적으로 치료될 수 있을 만큼 충분한 시간동안 혈액 내를 순환할 수 있다.

<48> 상기 본 발명의 실험시 조각난 적혈구의 유세포 분석 검출법은 비장 제거술을 받은 환자에게 발생하는 MAHA를 진단하고 모니터할 수 있는 유일한 방법이 될 것이다.

<49> 또한 말라리아 환자의 염색된 적혈구 비율은 정상인보다 유의적으로 높았다 ($1.87 \pm 0.72\%$, $P=0.001$). 말라리아는 말라리아 원충에 의해 유발되는 기생성의 질병이다. 따라서 손상된 적혈구 일부가 혈액내를 순환하고 있는 것을 발견하였다. 풍토성 지역에서 이 방법을 사용함으로써 발열 환자의 반복적인 검사를 통해 말라리아를 진단하는 데에 도움이 될 것이다.

<50> 구상 적혈구증 환자의 염색된 적혈구 비율은 정상인보다 유의적으로 높았으며 ($3.02 \pm 1.12\%$, $P=0.000$), 8명 모두가 염색된 적혈구 비율이 1% 이상인 것으로 나타났다.

<51> 본 발명의 검사 방법에 있어서, 유전적 구상 적혈구증 환자와 자가 면역성 용혈성 빈혈증 환자 사이에서는 염색된 적혈구의 비율이 차이가 없었다. 이러한 구상 적혈구 변화는 기존에도 연구되어왔고 세포질 막의 몇 가지 구조적 결함이 보고되었다. 그 결점들은 항혈색소 항체를 통과시킬 수 있을 만큼 충분히 큰 것으로 보인다. 유전적 구상 적혈구증을 진단하기 위한 실험실 테스트로서 삼투압 취약성 검사와 현미경 검사가 있다. 유전적 구상 적혈구증 환자 가족에 있어서, 환자의 부모와 2명의 형제는 정상적인 삼투취약성을 나타냈지만 부모의 아버지는 항혈색소에 의해 염색된 적혈구가 증가했음이 발견되었다. 이와 같은 결과는 본 실험에 따른 손상된 세포의 유세포 분석 검출법이 삼투압 취약성 검사보다 더욱 정확한 방법임을 나타내는 것이다. 자가 면역성 질병들은 미국에서 젊은 여성과 중년 여성들의 주요 사망 원인이다. 자가 면역성 용혈성 빈혈은 대략 10%의 전신성 홍반성 루푸스 환자에게 발생하지만 용혈이 경증인 경우가 더욱 일반적일 수 있다. 이것이 이 질병의 유일한 발병 징후일 수도 있고 다른 질병의 징후가 나타나는 것을 몇 년 앞당길 수도 있다. 그러나 직접 항글로불린 테스트가 자가면역성 용혈성 빈혈의 유일한 진단방법이므로 손상된 세포에 대해 이 유세포 분석기를 사용함에 따라 다른 질병의 징후가 나타나기 전에 경증의 용혈증을 초기에 검사할 수 있다. 난형 적혈구증도 역시 상당히 유전적인 질병이며 기능장애 또는 막 단백질 결핍증이 보고되었다. 난형 적혈구증 환자 2명 모두에서 구상 적혈구증 환자와 같이 항혈색소에 의해 염색된 적혈구가 증가한 것으로 나타났다. 따라서 구상 적혈구증과 난형 적혈구증이 주로 혈관외 용혈증에서 발견되지만 본 실

험 결과는 이들 이형 적혈구증의 막 결합이 저장액에서 항혈색소 항체가 통과하기에 충분할 만큼 크다는 것을 설명해주고 있다.

<52> 본 발명의 실험에서 모든 철 결핍성 빈혈 환자와 눈물 방울 세포 또는 표적 세포가 있는 환자는 항혈색소에 의해 염색된 적혈구의 증가가 나타나지 않았다. 이는 이들 이형 적혈구증 환자들이 손상된 세포질을 통해 혈색소를 노출하기에 충분한 막 결손을 가지고 있지 않음을 의미하는 것이다. 결론적으로, 저장액에서 항혈색소를 사용하여 손상된 적혈구를 검출하는 유세포 검사법은 간편하고 정확한 용혈성 빈혈 진단법이다. 또한 용혈성 빈혈의 초기 진단을 가능하게 하고 중요한 조각난 적혈구와 중요하지 않은 오래된 조각난 적혈구를 구별하는 데 도움이 될 수 있다.

【발명의 효과】

<53> 이상 같이 본 발명은 용혈성 빈혈 검사 방법에 있어서 생리 식염수 저장액에서 항혈색소를 이용하여 손상된 RBCs를 검출하는 유세포 측정법 실시하여 용혈성 빈혈의 신속한 진단뿐만 아니라 중요한 조각난 적혈구와 중요하지 않은 오래된 조각난 적혈구를 간단 용이하게 구별할 수 있도록 함으로서 유전, 임신 중독, 암, 골수 이식시, 폐혈증 환자, 화상을 입었을 경우 현재 환자의 적혈구가 판손 진행중인지 여부를 판단할 수 있음은 물론 기존의 현미경 검사 방법보다 더욱 정밀하고 시간이 지난 적혈구와 최근에 판손된 적혈구를 정확하게 진단할 수 있도록 된 효과를 갖게되었다.



1020000085709

출력 일자: 2002/2/28

【특허청구범위】

【청구항 1】

환자에서 혈액을 추출한 후 말초혈 $2\mu\text{l}$ 를 PE와 접합시킨 항혈색소 항체로 0.6% 소금물에서 상온에서 15분간 염색하는 단계와;

상기 PE와 접합시킨 항혈색소 항체로 0.6% 소금물에서 상온에서 15분간 염색한 다음 세척하지 않고 3ml의 식염수를 첨가하는 단계와;

상기 3ml의 식염수를 첨가하여 유세포 분석기로 분석하는 단계로 손상된 적혈구수와 적혈구가 오래 전에 파손된 것인지 최근에 파손된 것인지도 구별할 수 있도록 된 것을 특징으로 하는 용혈성 빈혈 검사 방법.